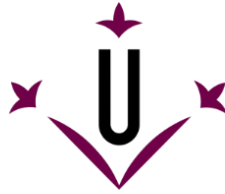


UNIVERSITAT DE LLEIDA
FACULTAT DE MEDICINA
GRAU EN NUTRICIÓ HUMANA I DIETÈTICA



Universitat de Lleida

Estudi *in vivo* sobre la farmacocinètica del colecalciferol en diferents dosis de suplementació

Esther Escribà Tardà

Curs: 2017-2018

Estudi *in vivo* sobre la biodisponibilitat del colecalciferol en diferents dosis de suplementació

Treball final de grau presentat per:

Esther Escribà Tardà

Treball dirigit pel Dr. José Carlos Enrique Serrano Casasola, del Departament de
Medicina experimental, de la Universitat de Lleida

Dr. José Serrano Casasola

Esther Escribà Tardà

Lleida, 03 de Juliol de 2018

AGRAÏMENTS

Després de quatre anys d'esforç, dedicació, motivació i aprenentatge ha arribat el moment més esperat abans de començar la vida professional, l'entrega del treball de fi de grau. Per aquest motiu m'agradaria dedicar un apartat d'aquest projecte per agrair a tota la gent que ha estat al meu costat al llarg d'aquests quatre anys, i sobretot, a les persones que han fet possible que aquest projecte es dugués a terme.

Primer de tot, agrair al meu tutor de pràctiques i treball de fi de grau el Dr. José Serrano Casasola tot l'esforç, dedicació, paciència i sobretot, hores que ha dedicat en aquest projecte. Gràcies al seu afany per la nutrició i la seva vocació en la docència la realització d'aquest treball ha sigut més fàcil.

Especialment, també vull donar les gràcies a la Meritxell Martín, per haver-me ensenyat els coneixements bàsics per treballar en un laboratori d'investigació clínica, per la l'ajuda en totes les tècniques utilitzades al llarg d'aquests mesos, i sobretot per l'atenció, la resolució de tots els dubtes (que no han sigut pocs), i els consells donats en cada moment adequat. Sense la seva dedicació no hagués sigut possible dur a terme aquest projecte. Per mi has sigut com una segona tutora, mil gràcies!

Per acabar, però no menys important, vull donar les gràcies a la meva família, especialment als meus pares i al meu germà ja que no hagués pogut realitzar la carrera sense la seva ajuda. Gràcies per apoiar-me sempre, animar-me en els moments més difícils i donar-me la seguretat necessària i confiança durant aquests quatre anys.

ÍNDEX

1. Resum	5
2. Antecedents.....	10
2.1 Bioquímica	10
2.1.1 Vitamina D i els seus derivats	11
2.1.2 Colecalciferol i ergocalciferol.....	11
2.2 Metabolisme	12
2.2.1 Origen de les vitamines.....	12
2.2.2 Hidroxilació hepàtica	13
2.2.3 Hidroxilació renal	13
2.2.4 Degradació i eliminació.....	15
2.3 Regulació.....	15
2.4 Biodisponibilitat	16
2.4.1 Definició	16
2.4.2 Biodisponibilitat vitamina D ₃	16
3 Justificació i objectius	20
4. Disseny.....	22
5. Materials i mètodes.....	23
5.1. Matriu i quantitat empleada	23
5.2 Extracció dels teixits	24
5.3 Extracció vitamina D	24
5.4 Identificació i quantificació de colecalciferol mitjançant UPLC.....	25
5.5 Estadística	26
6. Resultats	27
6.1 Quantificació de la vitamina D ₃ en sang.....	27
6.2. Quantificació de la vitamina D ₃ a l'intestí prim	29
6.3. Quantificació de la vitamina D ₃ al fetge	31
6.4 Relació i comparació del colecalciferol en els diferents teixits	32
6.4.1 Comparació entre les diferents dosis	32
6.4.2 Relació de les diferents dosis (100 µg /5 µg)	35
6.2 Quantificació de la vitamina 25-hidroxicolecalciferol	36

7. Discussió	37
8. Limitacions.....	37
9. Conclusions.....	41
10. Bibliografia.....	42

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Representació molecular de la vitamina D ₂ i D ₃ i els seus precursors	11
Figura 2. Resum gràfic de l'origen i metabolisme de la vitamina D.	13
Figura 3. Absorció de la vitamina D i els seus metabòlits a l'intestí prim	16
Figura 4. Esquema del disseny de l'estudi i representació de les mostres.....	22
Figura 5. Comparació entre les diferents dosis d'administració de vitamina D ₃ als diferents teixits.....	33
Figura 6. Concentració de 25-hidroxicolecalciferol present al fetge i en sèrum relacionat amb el temps transcorregut.....	35

ÍNDIX DE GRÀFIQUES

Gràfica 1. Concentració de vitamina D present en el sèrum dels ratolins en relació al temps transcorregut corresponent	27
Gràfica 2. Concentració de vitamina D present a l'intestí prim dels ratolins en el temps transcorregut correspost.	29
Gràfica 3. Concentració de vitamina D present al fetge relacionat amb el temps transcorregut.....	30

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Condicions de l'espectrometria de masses	25
Taula 2. Anàlisi de la biodisponibilitat de la vitamina D en sang.	29
Taula 3. Relació entre les diferents dosis de vitamina D ₃	35

1. Resum

La vitamina D juga un paper molt important en algunes malalties. Actualment, hi ha nombrosos estudis que relacionen el dèficit d'aquesta vitamina amb alguns problemes per la salut, no obstant això hi ha poca evidència científica que parli sobre la seva farmacocinètica a diferents dosis.

En aquest estudi es va determinar la biodisponibilitat de la vitamina D₃ i els seus metabòlits en ratolins. Es va avaluar l'efecte de l'administració d'un suplement oral amb dos dosis (5 µg i 100 µg) per quantificar-los en diferents teixits: intestí prim, fetge i sèrum ja que són punts claus pel seu metabolisme.

Els resultats demostraven que no hi havia una diferència significativa en la cinètica d'absorció entre les dos dosis, no obstant això la biodisponibilitat era major en la dosis de 5 µg. A més, les majors concentracions de colecalciferol es van observar en el teixit hepàtic en ambdós grups.

Es va concloure que el mecanisme de transport per l'absorció de vitamina D és un procés no saturable en les dosis administrades. A més a més, degut a l'increment de les concentracions al teixit hepàtic es diu que aquest és un reservori del colecalciferol.

Paraules clau: colecalciferol, biodisponibilitat, absorció i emmagatzematge.

Resumen

La vitamina D juega un papel muy importante en algunas enfermedades. Actualmente, hay numerosos estudios que relacionan la deficiencia de esta vitamina con problemas de salud, sin embargo hay poca evidencia científica que hable sobre su biodisponibilidad a diferentes dosis.

En este estudio determinó las diferencias sobre la biodisponibilidad de la vitamina D₃ y sus metabolitos en ratones. Se evaluó el efecto de la administración de un suplemento oral con dos dosis (5 mg y 100 mg) para cuantificarlos en diferentes tejidos: intestino delgado, hígado y suero, ya que son puntos claves para su metabolismo.

Los resultados demuestran que no hay una diferencia significativa en la cinética de absorción entre las dos dosis, sin embargo la biodisponibilidad era mayor en el grupo de 5 µg. Hay que remarcar que las mayores concentraciones de colecalciferol se observaron en el tejido hepático de ambos grupos.

Se concluyó que el mecanismo de transporte para la absorción de vitamina D es un proceso no saturable con las dosis administradas. Además, debido al incremento de las concentraciones en el tejido hepático se sabe que este, es un reservorio del colecalciferol.

Palabras clave: colecalciferol, biodisponibilidad, absorción i almacenaje.

Abstract

Vitamin D plays a very important role in some diseases. Currently, there are numerous studies that relate the deficiency of this vitamin with health problems. However, there is no much scientific evidence that describe about its bioavailability at diferents doses.

In this study we determined the differences on the bioavailability of vitamin D₃ and its metabolites in mice. The effect of the administration of an oral supplement with two doses (5 mg and 100 mg) was evaluated to quantify them in different tissues: small intestine, liver and serum, since they are very important points for its metabolism.

The results show that there is no significant difference in the absorption kinetics between the two doses. However, it was found bioavailability was higher in the group of 5 µg. It should be noted that the highest concentrations of cholecalciferol were observed in liver tissue in both groups.

It was concluded that the mecanism of transport for the absorption of vitamin D₃ it is a non-saturable proces with the doses administered. Moreover, due to the increase in concentrations it is said that hepatic tissue is the reservoir of colecalciferol.

Key words: *cholecalciferol, bioavailability, absorption i storage.*

2. Antecedents

Cada cop més hi ha estudis que parlen sobre les vitamines i els seus efectes envers algunes malalties. Es coneix que la vitamina D té un paper molt important en la regulació de la homeòstasis del calci i el metabolisme ossi. A més, actualment hi ha suficient evidència per dir que la deficiència de vitamina D té un efecte molt important en varies patologies com per exemple el raquitisme, la diabetis, el càncer, la insuficiència cardíaca o la malaltia renal crònica. S'ha demostrat en varis articles que la suplementació d'aquesta vitamina, en cas de dèficit, té funcions importants en la prevenció del raquitisme i infeccions respiratòries en nens(1), la disfunció cardiovascular (2), la disfunció renal (2–4), càncer de pròstata(5,6), entre d'altres...

Tot i els coneixements sobre els beneficis d'aquesta vitamina, s'ha vist que falta molta informació actual de la part bioquímica. La farmacocinètica és un tema poc estudiat i és difícil trobar experiments, revisions o articles que arribin a una conclusió sobre la biodisponibilitat, l'emmagatzematge, els transportadors utilitzats o els receptors d'activació a nivell genètic d'aquest micronutrient. Per tant, és un tema amb molta controvèrsia i es necessiten més estudis per corroborar el seu comportament i tenir una base sòlida pels posteriors experiments clínics.

2.1 Bioquímica

La vitamina D i els seus derivats són els *secosteroides* coneguts més importants. Aquest grup està format per compostos esterols que es coneixen, principalment, per la seva activitat antitumoral.

La seva nomenclatura original segons la nomenclatura química 3S-8.1 de l'organització Unió Internacional de Química Pura Aplicada (IUPAC)(7) és: (5Z,7E)-(3S)-9,10-*secocholesta*-5,7,10(19)-*men*-3-O1 i (5Z,7E,22E)-(3S)-9,10-*secoergosta*-5,7,10(19),22-*tetraen*-3-O1' per la vitamina D₃ i la vitamina D₂, respectivament. No obstant això, l'any 1989 es va canviar la seva nomenclatura per tal d'evitar confusions i facilitar el seu escrit als professionals.

2.1.1 Vitamina D i els seus derivats

El nom de vitamina D engloba diferents molècules actives i els seus derivats. Es poden diferenciar entre aquestes molècules(7):

- Colecalciferol (Vitamina D₃)
- Calcidiol o 25-Hidroxicolecalciferol
- Calcitriol o 1 α ,25-Dihidroxicolecalciferol
- Ergocalciferol (Vitamina D₂)
- Ercalcitriol o 1 α ,25-Dihydroxyergocalciferol
- Entre d'altres.....

Les molècules de vitamina D₃ i D₂, colecalciferol i l'ergocalciferol respectivament, provenen de les seves provitamines ergosterol i 7-dihidrocolesterol (7-DHC). Aquestes vitamines les podem obtenir mitjançant l'alimentació o mitjançant la llum ultravioleta i gràcies a les hidroxilacions que rebrà al fetge i al ronyo durant el metabolisme obtindrem les formes actives.

2.1.2 Colecalciferol i ergocalciferol

La vitamina D₂ i D₃ són molècules molt similars que tenen el mateix metabolisme. No obstant això tenen algunes diferències en la seva estructura molecular. La principal diferència entre aquestes dues molècules prové dels seus precursors (Figura 1). El precursor de la vitamina D₂ és l'ergosterol de les plantes i els fongs i el de la vitamina D₃ el 7-dihidrocolesterol (7-DHC).

A nivell químic es diferencien en què la vitamina D₂ té un doble enllaç entre el C22 i el C23 i un grup metil en la cadena lateral del carboni C24 (figura 1). La diferència de la cadena lateral disminueixen l'afinitat per la proteïna transportadora de la vitamina D (DBP), per tal la seva eliminació de sang més ràpida(8).

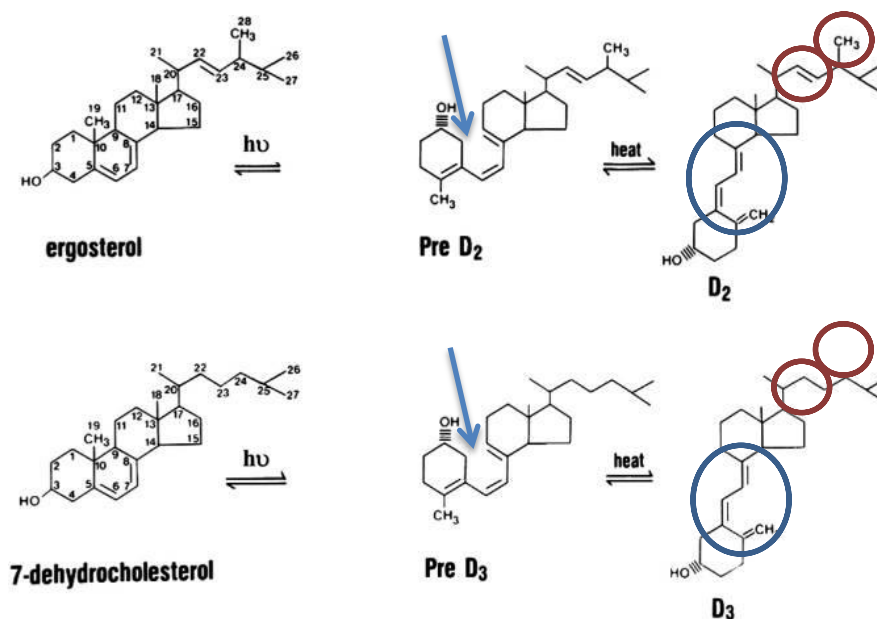


Figura 1 (8). Representació molecular de la vitamina D₂ i D₃ i els seus precursors. En la figura podem veure els canvis estructurals dels precursors de la vitamina D₂ i D₃. Senyalats en blau s'observa el trencament de l'anella i el encercla't es veu el canvi en la posició química perquè sigui una molècula més estable. Encercla't en vermell s'aprecien les diferències entre els dos tipus de vitamina no activa.

2.2 Metabolisme

Perquè les vitamines D₃ i D₂ puguin arribar a tenir la seva funció necessitem que aquesta sigui activa. Per aconseguir això es necessari que la molècula precursora passi per varies hidroxilacions durant el seu metabolisme i d'aquesta manera canviar l'estructura molecular. Un cop s'hagi activat aquesta podrà dur a terme diferents funcions de l'organisme com el metabolisme d'alguns minerals o l'acció immunitària contra algunes malalties.

2.2.1 Origen de les vitamines

La **vitamina D₂** la podem obtenir de dos maneres diferents, mitjançant la irradiació UV del sol o gràcies als aliments fortificats de vitamina D i la suplementació específica de ergocalciferol. A la indústria alimentària quan afegeixen vitamina D en algun aliment per aportar-li aquest micronutrient ho fan amb ergocalciferol, en comptes de colecalciferol.

La **vitamina D₃** també la podem obtenir de les dos maneres anteriors. La principal font és mitjançant la llum solar des del seu precursor 7-DHC o mitjançant la dieta gràcies aliments naturals com poden ser els peixos i olis, o suplementes de vitamina D₃.

La radiació solar provoca el trencament de la segona anella dels precursors ergosterol i 7-DHC i mitjançant un canvi estructural termo-sensible, per isomerització, obtenim la vitamina D. La melanina és l'encarregada de bloquejar la producció de la llum UV, per tant, és molt difícil tenir una intoxicació per excés d'aquesta vitamina (8,9). També impedeix l'inici del metabolisme d'aquest nutrient la roba o la crema solar ja que no es pot fer el trencament de l'anella del precursor.

2.2.2 Hidroxilació hepàtica

La proteïna d'unió a la vitamina D (BPD de l'anglès: Vitamin D Binding Protein) és l'encarregada d'unir-se a aquesta molècula i transportar-la a través de la sang fins al fetge. Per tal d'activar aquesta molècula, el primer pas ha de ser la hidroxilació, al carboni 25 de la molècula precursora, d'aquesta manera obtindrem la 25 α -hidroxicolecalciferol.

La transformació de la molècula es realitza gràcies a un enzim microsomal o mitocondrial pel citocrom P450. Es pensa que l'enzim CYP2R1 és la principal proteïna que actua en la hidroxilació (10–12) ja que té una gran afinitat cap a les vitamines D₂ i D₃, no obstant això també podem trobar altres enzims CYP3A4 i CYP2J3 que poden hidrolitzar-les (13). La producció de 25 α -hidroxicolecalciferol depèn de la concentració present en sang de la vitamina D₃.

2.2.3 Hidroxilació renal

Un cop s'ha realitzat la primera hidroxilació es transporta aquesta molècula cap al ronyó mitjançant l'ajuda de la proteïna BPD. L'enzim citocrom P450 monooxigenasa (CYP27B1), també conegut com 25(OH)D 1 α hidroxilasa i codificat pel gen CYP27B1 és l'encarregat de canviar l'estructura molecular de la vitamina 25 α -hidroxicolecalciferol (14). La hidroxilació de la molècula es du a terme al tub renal proximal on s'afegeix un grup OH al carboni 1 del primer anell. Aquest és el pas final per obtenir la forma activa

de la vitamina D o 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) (10). A més, també ens podem trobar la síntesis d'aquesta molècula a diferents cèl·lules de l'organisme degut a una acció autocrina (les cèl·lules epitelials de la pell (15), pulmons, ovaris, cèl·lules del sistema immunològic (16),...)

L'activitat d'aquest enzim es regula mitjançant diferents minerals com per exemple el calci, el fòsfat i les hormones reguladores del procés. Després de la seva producció es transporta mitjançant la proteïna DBP cap als teixits diana.

En qualsevol cas, si la vitamina D no sofreix les dos hidroxilacions no aconseguirem obtenir la molècula activa d'aquestes vitamines i no podrà dur a terme les seves funcions. A la figura 2 es representa tot el procés metabòlic d'aquesta vitamina.

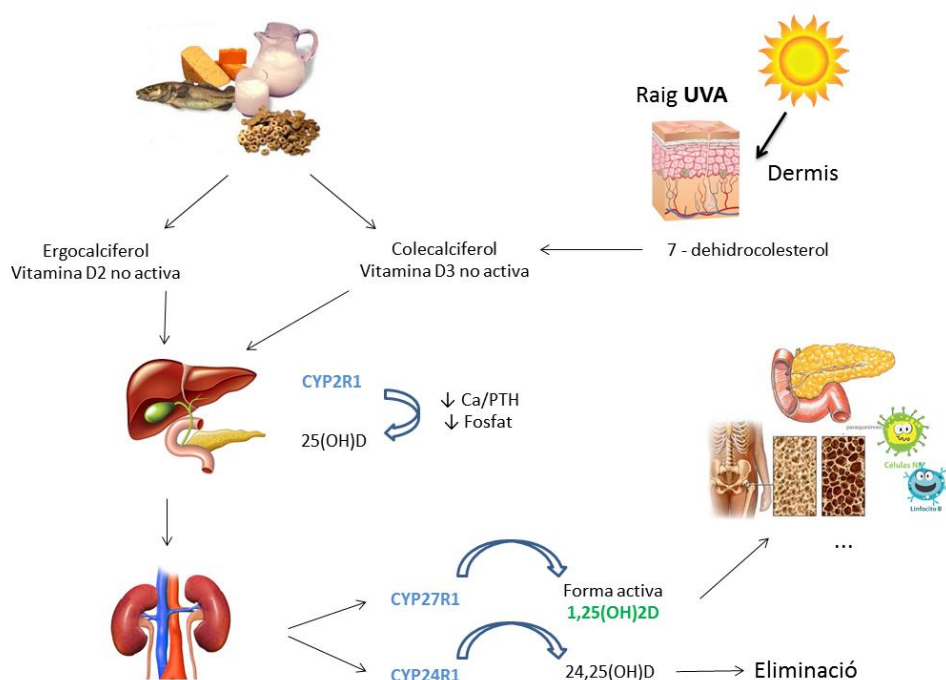


Figura 2 (17). Resum gràfic de l'origen i metabolisme de la vitamina D. Un cop la vitamina D₂ o D₃ té les dos hidroxilacions al fetge i al ronyó la molècula final passa a ser el metabòlit actiu d'aquest micronutrient i realitzarà les accions que li pertoca.

2.2.4 Degradació i eliminació

La degradació i eliminació de la molècula es pot realitzar mitjançant dos camins diferents com ara la hidroxilació del C24 de la molècula o per la via lactona mitjançant el C23.

L'enzim CYP24A1 és l'encarregat d'hidroxilar les molècules $25(\text{OH})\text{D}_3$ o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ al carboni 24 o al C23, depenent la via que s'utilitzi. Aquests canvis estructurals es realitzen per tal d'inactivar i disminuir l'acció dels metabòlits de la vitamina D. Després de diferents canvis estructurals obtindrem l'àcid calcitroic (figura 3) el qual s'excreta per la bilis i s'elimina a través de la fem o la molècula activa 1,25-26,23 lactona.

2.3 Regulació

La vitamina D sintetitzada a partir de l'exposició solar està regulada per les cèl·lules epidèrmiques de la pell. La quantitat produïda dependrà de la zona geogràfica, física i culturals, això és degut a que el metabolisme i la regulació d'aquest nutrient està molt influenciat per la genètica, la qual varia a cada zona. Es coneix que la síntesi d'aquesta vitamina es proporcionalment directa a l'augment de la pigmentació de la pell, ja que la melanina és una molècula important que bloqueja la seva producció. D'aquesta manera evitem la intoxicació malgrat una exposició al sol perllongada.

L'altra regulació de la vitamina D ens la torbem quan aquesta ja està al ronyó hidroxilada per segon cop. Es fa mitjançant la retroalimentació negativa directa per la producció d'algunes molècules. Així doncs, es sap que l'estimulació de CYP27B1 és causada per la PTH i inhibida pel factor de creixement dels fibroblasts com a senyal d'una alta concentració de fòsfor (P) i una alta concentració de calci (Ca). En canvi, la regulació de CYP24A1 és inhibida per la PTH i és estimulada per una alta concentració de Ca i P (8,13,18).

2.4 Biodisponibilitat

2.4.1 Definició

La biodisponibilitat és la proporció d'un nutrient el qual és absorbit per l'organisme i utilitzat pels diferents teixits diana per les funcions corporals normals. Segons la FDA la definició de biodisponibilitat és: "La velocitat i quantitat a la qual un fàrmac o component actiu, absorbit a partir de la forma de dosificació que el conté, es fa disponible en el seu lloc d'acció." (19)

La biodisponibilitat dels micronutrients com ara la vitamina D es veu afectada per diferents factors i, a més, hi ha grans diferències en la proporció en què s'absorbeixen i s'utilitzen. Aquests factors poden ser interns com ara la matriu de l'aliment, la forma química del nutrient i els compostos que hi ha presents o factors externs com ara l'edat, el sexe l'estat nutricional...

2.4.2 Biodisponibilitat vitamina D

Es creu que la vitamina D segueix el mateix criteri d'absorció i els mateixos factors intraluminals que els que s'han descrit per la resta de lípids (20). Així doncs, durant la digestió d'aquesta molècula també es duria a terme l'emulsificació, la solubilització de les micel·les per l'acció de les lipases pancreàtiques i la permeabilitat a través de la membrana enterocítica. A més, igual que els lípids, es creu que finalment es pot unir als quilomicrons per tal de ser transportada fins al fetge mitjançant la vena cava. Una altra hipòtesis de la seva absorció és la unió d'aquesta vitamina a una proteïna transportadora, concretament la BDP, soluble en sang. Aquesta és més permeable i ajudaria a la vitamina D a passar directament a la sang sense unir-se al quilomicro. D'aquesta manera arribaria al fetge mitjançant la vena porta .

2.4.2.1 Estómac

Un cop s'ingereix aquesta vitamina i va cap a l'estómac, els enzims, com s'ha observat amb la lipasa gàstrica (20), i el pH comencen a degradar l'aliment ingerit. Degut a la

seva similitud als lípids es creu que la pepsina juga un paper important en la seva absorció alliberant la fracció que està unida a proteïnes de la matriu alimentària.

2.4.2.2 Intestí prim

Un cop surt de l'estómac se'n va cap a l'intestí prim on, al duodè, es secreten proteases, amilases i lipases que ajuden a alliberar la vitamina D de l'aliment, com per exemple la lipasa pancreàtica ajuda a hidrolitzar la vitamina quan aquesta està esterificada. Seguidament, gràcies a l'acció dels àcids biliars que disminueixen la tensió superficial dels lípids es pot iniciar l'emulsió d'aquests necessari per la formació de micelles mixtes (22), permeten així el transport de la vitamina D a través dels enteròcits (Figura 3). Per tant, la bilis és un component molt important per l'absorció de les vitamines liposolubles.

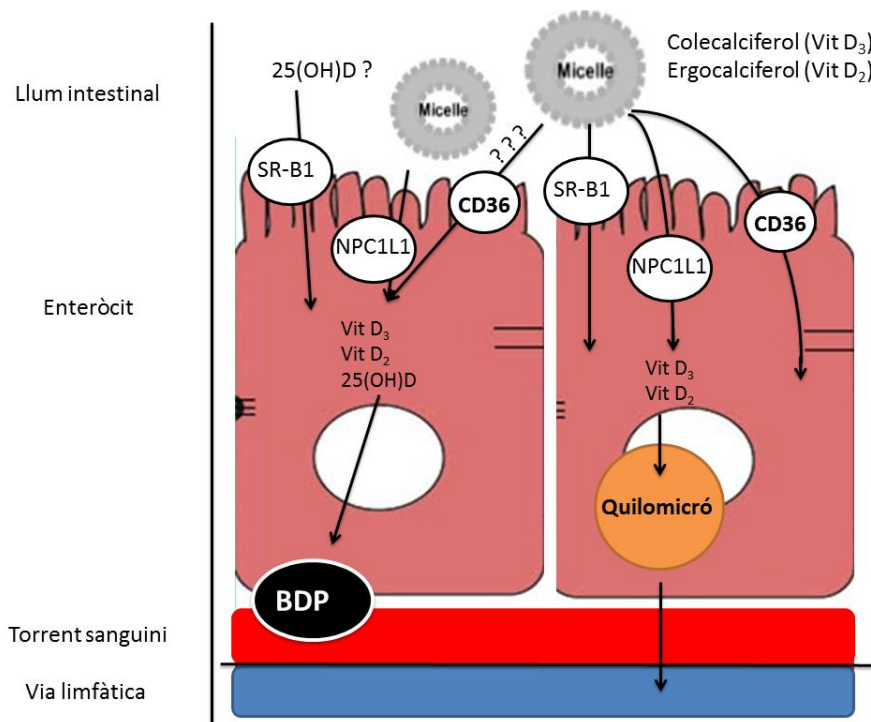


Figura 3 (23). Absorció de la vitamina D i els seus metabòlits a l'intestí prim. Les proteïnes involucrades en el transport i secreció dels camins. La vitamina D és transportada a l'interior de la cèl·lula mitjançant micelles a través de les proteïnes transportadores: SR-B1, CD36 i NPC1L1. Seguidament, es forma el quilomicro el qual a través de la limfa se'n va cap al fetge. Per altra banda, hi ha la hipòtesis en què la vitamina 25(OH)D i petites quantitats de vitamina D s'uneixen a la proteïna soluble BDP i d'aquesta manera passa al torrent sanguini.

2.4.2.3 Transport fins al fetge

Seguidament, es absorbidia pels enteròcits on s'uneix a diferents molècules. Existeixen dos hipòtesis sobre el comportament d'aquest micronutrient. Per una part es creu que dins dels enteròcits, un cop s'han format les micel·les mixtes, passa a formar part dels quilomicrons que mitjançant la via limfàtica arriba al fetge a través de la via cava. Per altra banda, la vitamina 25OHD₃ té un comportament més polar i no interacciona tant amb els àcids biliars (22), per això es creu que al ser més soluble en aigua s'uneix al transportador BPD (figura 3), per ser traslladat a través de la vena porta hepàtica fins al fetge. Falta més informació sobre la via que s'utilitzaria en el cas de la vitamina D₃ no hidroxilada.

Un equip Israelí (25) va valorar, per cromatografia líquida d'alta pressió, la quantitat de vitamina D amb rates. Els diferents teixits que van quantificar van ser: el duodè, jejú, ileo, el fetge i el ronyó, a més a més, també van estudiar la limfa i el plasma. Van concloure que, la vitamina D s'absorbeix principalment des de la llum intestinal cap a la limfa mesentèrica i només en quantitats insignificants se'n va directament cap al sistema venós portal. No obstant això, els metabòlits més polars (25(OH)D i 1,25(OH)₂D) s'absorbeixen preferentment al sistema portal i també a la limfa.

2.4.2.4 Absorció

Actualment hi ha controvèrsia sobre el mecanisme d'absorció de la vitamina D. Per una part, s'ha indicat en varis estudis que és un procés de difusió passiva no saturable (26–28). Per una altra banda, s'ha vist que si la concentració de vitamina D és baixa el mecanisme d'intervenció és, principalment, per proteïnes. En un estudi que va utilitzar la línia cel·lular intestinal humana Caco-2 i les cèl·lules transfectades amb HEK va demostrar que les proteïnes de la membrana cel·lular intestinal estan implicades en l'absorció d'aquestes formes no hidroxilades (24). Aquestes proteïnes són: SR-BI (receptor Scavenger classe B tipus 1), CD36 (Clúster Determinant 36) i NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1).

Segons s'ha observat, es creu que hi ha d'haver un transportador específic en el jejú que ajuda a l'absorció d'aquest micronutrient ja que la seva absorció és major que en el duodè. També es pensa que el mecanisme d'absorció dels metabòlits hidroxilats és diferent als de la vitamina D ja que aquests no depenen de la bilis per l'absorció. A més s'ha vist que l'eficàcia d'absorció és major que en les formes no hidroxilades (29). A més, el pic més que s'ha vist en infants, és entre les 6 i 12 hores, després té tendència a disminuir (20).

Finalment, els factors que poden modificar l'absorció són: les formes moleculars de vitamina D, els vincles moleculars, la matriu alimentària, la composició de l'àpat, la quantitat ingerida, efectors d'adsorció com ara l'activitat enzimàtica, la genètica i l'eficàcia del transport a través de l'enteròcit (12).

3 Justificació i objectius

Segons els antecedents sabem que les fonts alimentàries de vitamina D no cobreixen totes les necessitats de l'organisme, sinó que la gran part d'aquesta l'obtenim gràcies a la síntesis cutània. Així doncs, les ciutats i els països on no tenen gaire llum solar és molt probable que presentin un dèficit d'aquest micronutrient, i per tant, s'hagin de suplementar via oral. De la mateixa manera, les persones grans amb una baixa exposició a la llum solar.

Al laboratori s'havien de quantificar unes mostres per saber la quantitat de vitamina D present en sang de persones que viuen en una societat poc lluminosa. Abans de realitzar l'anàlisi de les mostres reals es van fer unes proves amb gent del laboratori per tal d'optimitzar el mètode. Així doncs, es va agafar la sang durant diferents hores del dia, vigilant l'alimentació de la persona i la situació meteorològica del dia (preferible que estigués boirós), per quantificar amb més fiabilitat el colecalciferol i no hi hagués interferències exògenes.

La sorpresa va ser quan es va veure que el pic més alt obtingut en vitamina D es marcava a les 10 hores. Això va generar gran interès per aprofundir en aquest tema. Així doncs, es va voler investigar sobre la farmacocinètica de la vitamina D (colecalciferol – vitamina D₃; 25-hidroxicolecalciferol i 1,25-dihidroxicolecalciferol), per ser més específics, es va voler observar la seva absorció i el seu emmagatzematge. En un principi, la hipòtesis que es va fer era que com més dosis ingerida, obtindríem un pic més alt. A més, es volia corroborar i investigar sobre el pic de les deu hores i l'acció que tenia anteriorment la molècula.

A part d'això, també es volia determinar el seu mecanisme d'absorció. Es va pensar que la via per arribar al fetge no seria el mateix en els diferents metabòlits (colecalciferol o 25-hidroxicolecalciferol) ja que l'estructura molecular, la polaritat o la quantitat obtinguda pels aliments no és la mateixa. No obstant això, es va posar especial atenció amb la via del colecalciferol. Les dos vies que es tenien presents era mitjançant la unió a un quilomicro o mitjançant la via portal hepàtica. Es creia que la vitamina D₃ seria transportada principalment per quilomicro, no obstant això, es tenia el dubte que depenen de la dosi aquest mecanisme es pogués saturar i ho es fes

també mitjançant la via porta. Per altra banda, es pensava que el metabòlit 25-hidroxicolecalciferol anava per via porta hepàtica.

Així doncs, per tal de poder observar la corba de la biodisponibilitat i intentar determinar la via de transport fins al fetge es va decidir dur a terme el projecte amb ratolins. D'aquesta manera era més fàcil quantificar la concentració de colecalciferol en diferents teixits i obtenir la corba necessària per veure el seu comportament.

Finalment, fent una recerca literària es va veure que la informació actual que hi havia de la vitamina D sobre la seva biodisponibilitat a diferents dosis i el seu emmagatzematge era molt escassa. Això va generar una dificultat a l'hora de trobar informació prèvia adequada i mètodes vàlids per la realització de l'experiment.

L'**objectiu** principal d'aquest treball és determinar la farmacocinètica de la vitamina D utilitzant diferents dosis: una baixa de 5 µg i una de alta de 100 µg.

Com a **objectius específics** es vol:

- Confirmar que el pic màxim de vitamina D en sang es troba aproximadament a les 10 hores.
- Determinar l'efecte de la dosis en els nivells d'absorció en ratolins.
- Comparar la quantitat de vitamina D que es troba en els diferents teixits en les diferents hores.
- Investigar sobre la via de transport del colecalciferol al fetge depenent de la dosis administrada.

4. Disseny

Estudi pilot *in vivo* amb una mostra $n=20$ on s'observarà la determinació quantitativa de vitamina D que es troba en diferents teixits. Els animals utilitzats en aquest experiment eren ratolins mascles de 45 dies d'edat. La soca era Black-6 comprats a Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). La mitjana del pes era de 22,23 grams amb una desviació estàndard de $\pm 1,60$. Van ser mantinguts a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\% \pm 10$ d'humitat relativa amb un cicle de 12:00 – 12:00 hores de llum/fosc. El deslletament es va dur a terme al cap de 21 dies quan es van separar els ratolins per gènere. Aquests seguien una dieta de cria del proveïdor Harlan fins 30 minuts abans de realitzar l'experiment, el qual se'ls deixava sense alimentació.

L'administració de calciferol és de forma oral per *gavage* mitjançant una sonda orogàstrica on s'acaba depositant el contingut a l'estómac. La dosi administrada d'aquest micronutrient és diferent en cada ratolí, com també el temps d'anàlisi dels diferents teixits, tal i com es mostra a la figura 4. La finalitat és analitzar les diferents concentracions de vitamina D al fetge, intestí prim i sang.

A posteriori, en el temps corresponent, els ratolins són dislocats per obtenir els teixits necessaris. El sèrum s'obté per punció pericardíaca. Com a mostra de teixit hepàtic s'agafa el lòbul més gran de l'animal i finalment, l'intestí prim. Seguidament, són congelats amb nitrogen líquid.

Un dels teixits que hem agafat ha sigut l'intestí prim, el qual ens aportarà informació sobre l'absorció de la vitamina D. Es sap del cert que els llocs més importants d'absorció d'aquesta vitamina en els ratolins és tant al jejú com al íleon (25). Malauradament, no hi ha suficient informació que indiqui en quina part s'absorbeix amb més quantitat en els humans. L'altre teixit que hem agafat ha sigut el fetge ja que volem saber si és un possible lloc d'emmagatzematge per aquest micronutrient.













Dosis administrada	Temps transcorregut des del <i>gavage</i> (hores)				
 5 µg (Grup A)	 2 hores	 4 hores	 6 hores	 8 hores	 10 hores
 100 µg (Grup B)	 2 hores	 4 hores	 6 hores	 8 hores	 10 hores

Figura 4. Esquema del disseny de l'estudi i representació de les mostres. Es van utilitzar dos grups experimentals per l'administració del suplement de colecalciferol: un d'ells amb baixa concentració de la vitamina (5µg – grup A) i un altre a altes dosis de la vitamina (100 µg – grup B). D'ambdós grups es van agafar deu ratolins i es va sacrificar a les 2,4,6,8 i 10 hores per comprovar la biodisponibilitat d'aquesta. De cada un d'ells se'ls agafava el sèrum, l'intestí prim i el fetge i es quantificava la vitamina D₃ i els seus metabòlits.

5. Materials i mètodes

5.1. Matriu i quantitat empleada

Per l'administració de vitamina D es va utilitzar el suplement farmacèutic DELITUS, on una ampolla unidosis de 2,5 mL de solució oral conté 25.000 UI de colecalciferol (vitamina D₃), equivalents a 0,625mg. Es fabrica per ITALFARMACO S.A (Madrid, Espanya) i el seu C.N és 701217. El lot que es va utilitzar era el 02117 amb data de caducitat el 03/2021.

Trenta minuts abans d'injectar les dosis adequades de vitamina D es va deixar els ratolins sense menjar per tal que no interfereixi amb el micronutrient que es donava a posteriori. A més, durant l'experiment no se'ls va proporcionar cap tipus de subsistència.

Les quantitats administrades de colecalciferol van ser de 5 µg i 100 µg. Això equival a 400 µl del complement Deltius per la concentració més alta. Per tal de fer la dilució es

va agafar 20 µl del suplement i es va mesclar amb 380 µl d'oli d'oliva, ja que és l'ingredient base del suplement.

5.2 Extracció dels teixits

Un cop es va dislocar l'animal, es va treure la sang ràpidament per punció cardíaca mentre aquest encara batejava. El sèrum es va obtenir després de permetre la coagulació d'aquesta i eliminar el coàgul resultant mitjançant la centrifugació. D'aquesta manera es van extreure les cèl·lules i les proteïnes involucrades en la coagulació (principalment fibrinogen). Un cop es va separar el sèrum del coàgul, es va congelar mitjançant nitrogen líquid.

Per les mostres dels teixits es va agafar l'intestí prim i el lòbul més gran del fetge del ratolí. Aquests van ser netejats amb una solució salina tamponada amb fosfat (PBS) amb una molaritat del 10%. Seguidament, van ser ràpidament congelats amb nitrogen líquid.

5.3 Extracció vitamina D

Per l'extracció de la vitamina D dels teixits (fetge i intestí prim) es van pesar 1200 mil·ligrams. Aquests es van mesclar amb una solució tampó PBS de pH 7,4 i seguidament es van homogeneïtzar-los mitjançant el Ultra-Turrax (3420000 IKA T10).

Un cop obtinguda la mostra es van agafar 500 µl d'aquesta (30), es va afegir 500 µl d'ACN i es va vortejar durant un minut per centrifugar-ho durant deu minuts a 4°C i 10.000 rpm. De les dos capes obtingudes es va agafar el sobrenedant, on hi havia les molècules lipídiques. Seguidament, es va afegir 400 µl de K_2HPO_4 0,4 M i 500 µl de metil tert-butil éter, es va vortejar i es va centrifugar a 4°C durant cinc minuts a 10.000 rpm. Per acabar aquesta part, es va agafar la capa d'èter (sobrenedant), es va evaporar amb nitrogen gas i es va congelar.

Finalment, 24 hores anteriors a la lectura dels resultats es va agregar 100 µl de 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione al 97% (PTAD) i es va deixar derivatitzant. Abans d'afegir als vial es va filtrar per tal de treure les impureses.

5.4 Identificació i quantificació de colecalciferol mitjançant UPLC

La identificació i quantificació de colecalciferol es va fer mitjançant cromatografia líquida d'alta pressió (ACQUITY UPLC mòdul de separació, Waters). Es va seguir el protocol de Pavel A. Aranov et al. (31). La columna que es va utilitzar era UPLC BEH C18 2.1×100 mm 1.7 (Waters).

La fase A aquosa estava formada per un 10% v/v d'acetonitril (ACN) amb aigua, com a modificador hi havia l'àcid fòrmic amb una concentració de 0,1%. La fase B orgànica era 100% metanol. Les condicions inicials eren 60% B amb una taxa de flux de 0.4 mL/min. El gradient del programa que es va utilitzar per la lectura de la vitamina era: 0–1 min 60% B; 7 min 72% B. Després de la separació del compost, la columna es va netejar amb 100% B durant dos minuts i equilibrat amb 60% durant dos minuts a una taxa de flux de 0,4 mL/min. El l'espectròmetre de tàndem de masses de *Quattro Premier*(Waters) va ser operat amb mode d'electroesprai positiu amb el voltatge capil·lar a 3.00kV. La taxa de flux del nitrogen gas va ser fixat amb un flux de gas de con de 25L/h i el flux del dissolvent gasós es de 700L/h. Es va aplicar una temperatura d'origen de 125°C i una temperatura de deshidratació de 350°C. L'argó es va utilitzar com a gas de col·lisió a $2,2 \times 10^{-3}$ mbar.

Per obtenir els pics de la cromatografia estables (12-20 punts per pic), les funcions MRM (control de reaccions múltiples) es van dividir en tres grups amb 0,25s de temps de permanència per a cada reacció mostrada a la Taula 1 (MRM1: 0-4.75 min, 24R,25(OH)₂D₃; MRM2: 4.50-6.50 min, 1α,25(OH)₂D₃; MRM3: 6.25-8.00 min, 25(OH)D₃).

Derivació PTAD	Tensió del con (v)	Precursor iònic (m/z)	Energia de col·lisió (v)	Producte (m/z)
D ₃ (cholecalciferol)	35	560,3	20	298,0
25(OH)D ₃	20	558,3	16	298,0
1α,25(OH) ₂ D ₃	32	574,3	18	314,0
24R,25(OH) ₂ D ₃	25	574,3	20	298,0

Taula 1. *Condicions de l'espectrometria de masses.*

5.5 Estadística

L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el programa GraphPad Prism5 per Windows. Pel càlcul de les diferències estadístiques es va utilitzar un anàlisi de dos vies ANOVA per tal de comparar els grups de les dos dosis de vitamina D administrada. A més a més, també es va utilitzar el anàlisi de variància d'una via ANOVA (One-Way ANOVA com a prova Port-Hoc se per la comparació del mateix grup en el temps corresponent. El test utilitzat era de Bonferroni amb un IC del 95% (significatiu al 0,05)

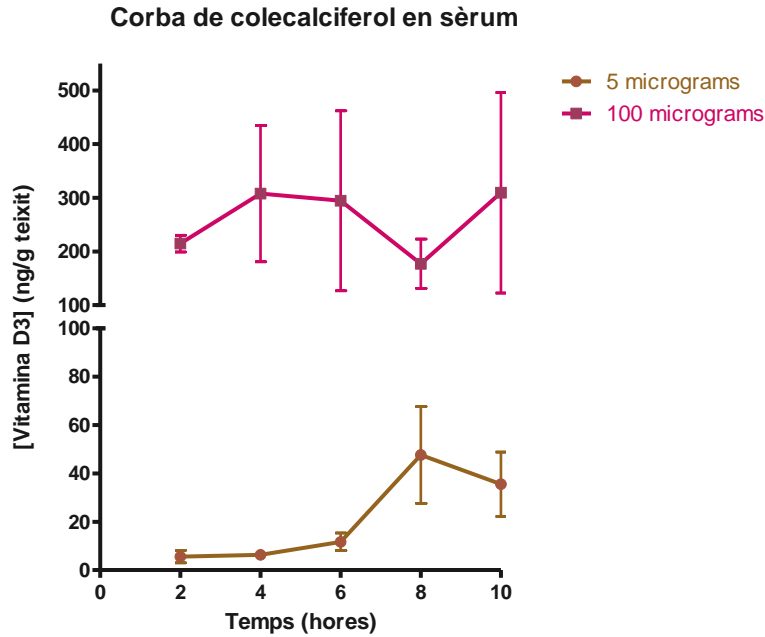
Els resultats amb una diferència del valor $p < 0,05$ es van considerar estadísticament significatives. Gràficament es representava amb * en el cas de $p < 0,05$, ** en el cas que $p < 0,01$ i *** en el cas que $p < 0,001$.

6. Resultats

6.1 Quantificació de la vitamina D₃ en sang

La biodisponibilitat de la vitamina D₃ es va determinar gràcies als resultats obtinguts amb l'UPLC dels diferents teixits. Primer es va observar la concentració que hi havia de vitamina D present en sèrum de les diferents hores establertes. D'aquesta manera es va poder determinar el pic més elevat d'aquesta molècula en sang i, per tant, la seva absorció.

La gràfica 1 mostra la quantitat de colecalciferol present en sang al llarg de les deu hores en ambdós grups. Els ratolins suplementats amb 5 µg de colecalciferol tenen un augment de la concentració més progressiva. La diferència entre hores no és estadísticament significativa, però s'obté el pic més elevat a les vuit hores amb una concentració de $47,67 \pm 28,34$ ng/mL. A les deu hores ja comença a disminuir la quantitat a $35,5 \pm 18,87$ ng/mL. Per altra banda, en el grup de la dosi de 100 µg hi ha un increment a les dos hores de $214,8 \pm 15,55$ ng/g i es manté constant el llarg del temps, on a les deu hores encara conté $309,5$ ng/g $\pm 186,87$ de teixit. Per tant, no hi ha diferències estadísticament significatives en les dosis de 100 micrograms durant el temps establert.



Gràfica 1. Concentració de vitamina D present en el sèrum dels ratolins en relació al temps transcorregut corresponent. En aquest gràfic es veu la informació recopilada de la quantitat de vitamina D₃ (ng/g de teixit) en sang al llarg de les deu hores. Població N=20 ratolins mascles de 45 dies, soca BL6. Els grups intervinguts es diferenciaven en la dosi administrada: 5 µg (color marró – forma de cercle) i 100 µg (color granat – forma quadrada). La variable Y determina la concentració de vitamina D₃ (ng/g de teixit) i en la variable X es representa el temps en hores. Es representa la mitjana dels resultats obtinguts amb la desviació estàndard (DE).

L'estimació de la biodisponibilitat de la concentració màxima (taula 2) es va comparar mitjançant el càlcul del percentatge de colecalciferol, la concentració màxima i el temps mig. Mirant la quantitat més alta d'ambdues concentracions i tenint en compte el percentatge que representa sabem que l'absorció d'aquesta vitamina és més elevada en dosis petites que en altes, és a dir, la dosi de 5 µg mostra una major disponibilitat que la dosi de 100 µg.

El temps mig de la concentració més alta és a les 8 hores i 10 hores respectivament. No obstant això, en el cas del segon grup no s'observa una disminució posterior, per això, s'ha indicat el temps mig relatiu¹. Per arribar a saber el T_{1/2} exacte s'hauria de realitzar un estudi amb més temps d'anàlisi post-prandial.

A l'apartat 6.4 es compara i s'explica la relació entre les dues dosis segons el temps que li correspon.

Biodisponibilitat	5 µg	100 µg
$C_{m\grave{a}x}$	47,6 ng/mL	309,4 ng/mL
$T_{1/2}$	8 hores	10 hores (temps mig relatiu) ¹
$\%s\grave{e}r[max]$	1,7%	0,6%

Taula 2. Anàlisi de la biodisponibilitat de la vitamina D en sang. Comparació dels dos grups experimentals de 5 i 100 µg. Els paràmetres utilitzats són els següents: el percentatge de vitamina D present en el teixit en el pic màxim respecte de la ingesta administrada inicialment ($\%s\grave{e}r[max]$); la concentració màxima ($C_{m\grave{a}x}$), com a indicador de la quantitat i finalment, el temps mig ($T_{1/2}$), el qual ens indica el temps que ha transcorregut per arribar a la màxima concentració.

6.2 Quantificació de la vitamina D₃ a l'intestí prim

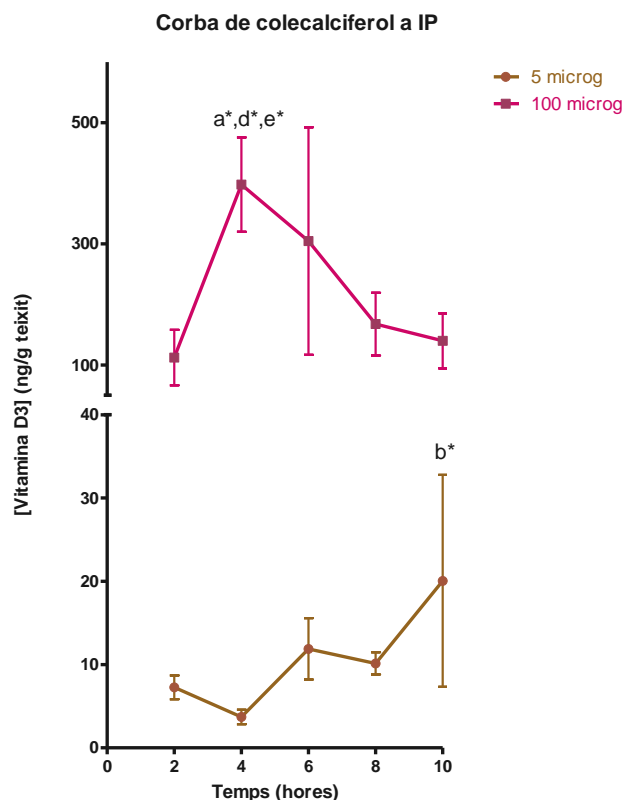
En els resultats anteriors es va veure que la proporció d'absorció de colecalciferol era més alta amb la dosi de 5 µg. Per saber, si a dosis elevades aquesta es podia emmagatzemar o es saturaven els transportadors de l'intestí prim es va quantificar els diferents metabòlits en aquest teixit.

Les diferències entre les dues dosis administrades és molt clara (gràfica 2). A les dos primeres hores, els ratolins de 5 µg de colecalciferol absorbeixen una quantitat menor d'aquest micronutrient (7,2 ng/g ± 1,24 de teixit i 3,7 ng/g ± 0,75 de teixit respectivament), per contra, aquells amb una dosi de 100 µg absorbeixen una quantitat més alta (112,27 ± 45,77ng/g de teixit i 397,92± 77,99ng/g de teixit, respectivament).

En canvi, a les hores posteriors podem veure com el grup de 5 µg va augmentant la dosi present a l'intestí prim arribant a una concentració de 20,07 ng/g de teixit ± 11,01, però el grup de 100 µg disminueix fins arribar a una concentració mitja de 139,92 ng/g ± 45,45 de teixit.

Si comparem els dos grups per separats es veu que ambdós presenten diferències estadísticament significatives. Els ratolins els quals se'ls va administrar 100 µg de vitamina D₃ tenen un P.value = 0,0042. Per tant, es pot dir que les diferències entre les diferents hores són estadísticament significatives. Concretament, hi ha diferències

significatives si es compara la quantitat de les 4 hores amb les de 2,6 i 8 hores. Per altra banda, els ratolins de menors dosis mostren una diferència significatives amb un *P value* de 0,024, que es pot apreciar a les deu hores.



Gràfica 2. Concentració de vitamina D present a l'intestí prim dels ratolins en el temps transcorregut corresponent. Informació recopilada de la quantitat de vitamina D3 (ng/g de teixit) a l'intestí prim al llarg de les deu hores. Població N=20 ratolins mascles, de 45 dies de vida de la soca BL6. Els grups intervinguts es diferenciaven en la dosi administrada: 5 µg (color marró – forma de cercle) i 100 µg (color granat – forma quadrada). La variable Y determina la quantitat de vitamina D3 (ng/g de teixit) i en la variable X es representa el temps en hores. Els resultats es mostren com a mitjana ± DE. Les diferències significatives (*p value* < 0,05) es marquen com: a -> diferència respecte el temps 2 hores, b -> diferència respecte les 4 hores, d -> diferència respecte les 8 hores, e -> diferència respecte les 10 hores i es representa gràficament amb * en el cas de *p*<0,05, ** en el cas que *p*<0,01 i *** en el cas que *p*<0,001.

Finalment, per tal de tenir una informació més acurada i poder comparar els resultats entre ambdues dosis es va calcular la relació de cada teixit, hora i dosi administrada. Els valors dels dos grups estan especificats a l'apartat 6.4.

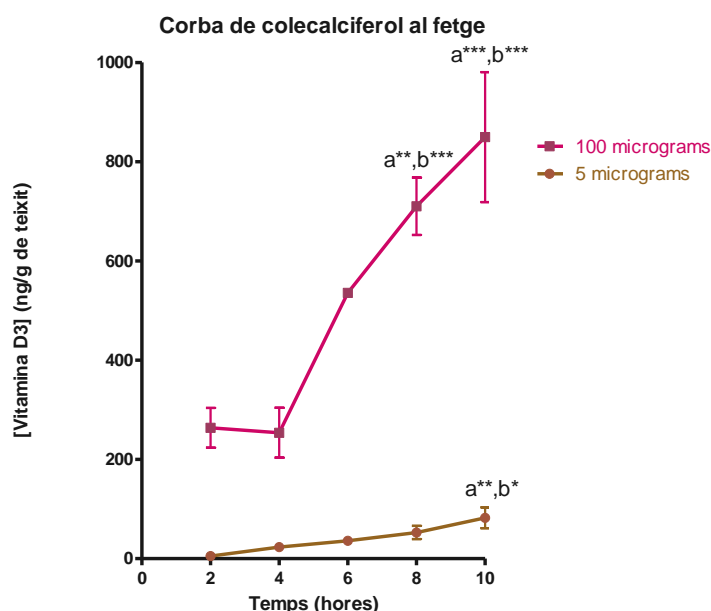
6.3 Quantificació de la vitamina D₃ al fetge

L'últim anàlisi es va fer del teixit hepàtic ja que també podia ser un possible reservori d'aquest micronutrient, i a més, és el principal lloc d'hidroxilació de la vitamina D₃.

En la gràfica 3, s'observa que el grup amb la dosi administrada de 5 µg té una corba més estable, sense cap pic pronunciat. No obstant això, la presència de colecalciferol augmenta progressivament durant les deu primeres hores arribant a una concentració màxima de $82,42 \pm 42,01$ ng/g de teixit. Aquest increment és significatiu ($p=0,0054$) i la quantitat de colecalciferol a les 2 i 4 hores presenta diferències significatives respecte a les 10 hores.

Per altra banda, el grup de 100 µg presenta un augment molt pronunciat a partir de les sis hores, i aquest incrementa de manera significativa ($p < 0,0001$) fins a les deu hores. La concentració màxima és de $849,75 \pm 261,88$ ng/g.

No obstant això, no podem saber si la concentració màxima obtinguda d'ambdós grups pot arribar a ser el pic més alt de la recta ja que no sabem si aquesta seguiria augmentant a les dotze hores o disminuiria.



Gràfica 3. Concentració de vitamina D present al fetge relacionat amb el temps transcorregut.
Informació recopilada de la quantitat de vitamina D₃ (ng/g de teixit) al fetge durant deu hores. Població N=20 ratolins mascles de 45 dies de vida, soca BL6. Els grups intervinguts es diferenciaven en la dosi

administrada: 5 µg (color marró – forma de cercle) i 100 µg (color granat – forma quadrada). La variable Y determina la quantitat de vitamina D3 (ng/g de teixit) i la variable X representa el temps en hores. Els resultats es mostren com a mitjana ± DE. Les diferències significatives es representen gràficament com: a: diferència respecte el temps 2 hores, b: diferència respecte les 4 hores i es mostren amb * en el cas de $p < 0,05$, ** en el cas que $p < 0,01$ i *** en el cas que $p < 0,001$.

6.4 Relació i comparació del colecalciferol en els diferents teixits

6.4.1 Comparació entre les diferents dosis

En aquest apartat es mostren les comparacions entre els dos grups de ratolins. Anteriorment, s'ha fet la comparació depenent de les hores. En canvi, els resultats actuals estan expressats en percentatge (%) per tal que siguin comparables en ambdós grups ja que els valors s'han calculat tenint en compte la dosi administrada inicialment.

Observant els diferents gràfics de la figura 5 es pot veure com inicialment, a les dos hores, la quantitat de vitamina D₃ en els diferents teixits és major en la dosi de 100 µg, exceptuant l'intestí prim el qual presenten el mateix percentatge de colecalciferol. Per conèixer específicament la relació de les dos quantitats ens fixem amb la figura 6. Aquesta ens indica que a les dos hores el fetge presenta 2,47 vegades més de colecalciferol en el grup d'altas dosis, de la mateixa manera també ens informa que presenta 1,91 vegades més en sèrum, en canvi, a l'intestí prim la quantitat és molt similar.

A les quatre hores el resultat més impactant és a l'intestí prim on es veu clarament un pic en el grup de 100 µg que indica que conté 5,37 vegades més de colecalciferol que el ratolins que s'han administrat una baixa dosi taula 2.

Seguidament, a les sis hores podem veure com els resultats són diferents en cada teixit. En primer lloc, la relació d'aquesta molècula en el sèrum és molt similar, però és lleugerament més alta en la dosi elevada, en quant a l'intestí prim, podem veure que és 1,55 vegades més gran en 100 µg, en canvi, la relació en el teixit hepàtic és més alta pel grup de 5 µg.

Després de vuit hores podem ressaltar que la biodisponibilitat de colecalciferol absorbida és més alta en els ratolins amb una dosi de 5 µg, el qual representa un 1,67% de colecalciferol del total absorbit (3,74%), en canvi el grup B representa a les deu hores un 0,31% de colecalciferol del total absorbit en sèrum (2,28%). Tenint en compte que el valor de les vuit hores al grup B és atípic no seria possible comparar-lo en els dos grups, per tant s'hauria de repetir el valor ja que a la gràfica 1 també s'aprecia una disminució poc esperada. A més a més, també es pot veure com en el teixit hepàtic la quantitat d'aquesta vitamina és més alta en aquest grup.

Per acabar, en la figura 5 es pot veure com en els ratolins que s'havia administrat la dosi de 5 µg tenen el pic més alt en tots els teixits analitzats (gràfic - A,B,C), amb una relació bastant elevada en comparació amb el grup de dosi alta. El percentatge total de cada teixit en el grup A és de: fetge (5,34%), intestí prim (0,76%) i sèrum (3,75%), tenint un total de colecalciferol absorbit del 9,84%. Per altra banda en el grup B: fetge (3,5%), intestí prim (0,94%) i sèrum (2,28%), amb un total de 6,71%.

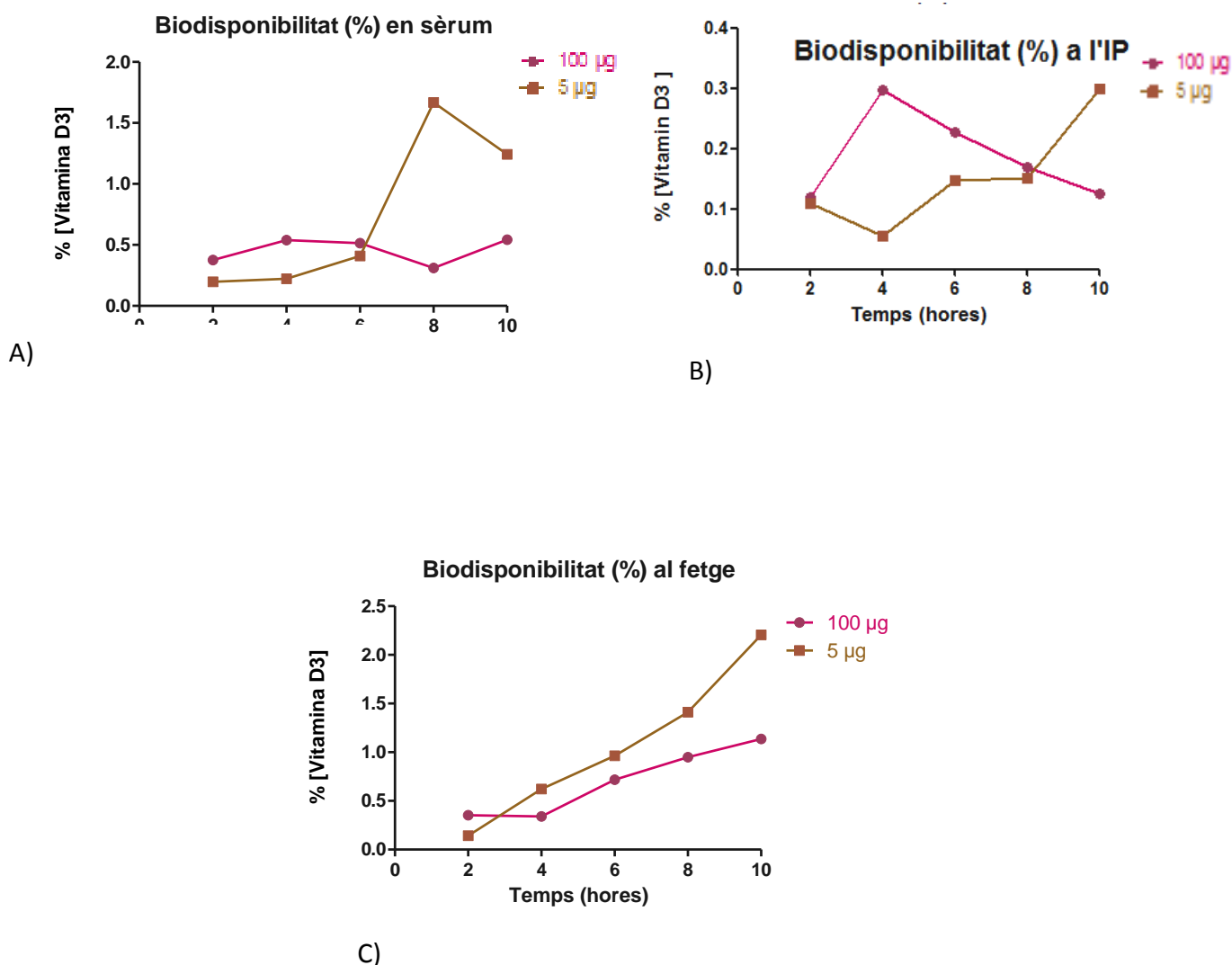


Figura 5. Comparació entre les diferents dosis d'administració de vitamina D₃ als diferents teixits. En tots els gràfics tenim: població N=20 ratolins mascles de 45 dies de vida, soca BL-6. Els grups intervinguts es diferenciaven en la dosi administrada: 5 µg (color marró – forma de cercle) i 100 µg (color granat – forma quadrada). La variable Y determina el percentatge (%) de vitamina D₃ i la variable X representa el temps en hores. Els valors es representen amb percentatge. Aquest s'ha calculat tenint en compte la quantitat de vitamina que s'havia administrat inicialment, d'aquesta manera podem comparar els paràmetres dels dos grups. El gràfic A representa els resultats obtinguts del sèrum, la gràfica B mostra els valors obtinguts dels enteròcits (intestí prim) i finalment, la gràfica C ensenya els paràmetres obtinguts del teixit hepàtic.

6.4.2 Relació de les diferents dosis (100 µg /5 µg)

Per poder visualitzar els gràfics anteriors amb més precisió s'ha calculat la relació dels dos grups (taula 3).

La taula ens indica que a les dos hores el percentatge de vitamina D₃ és més elevat en el grup de 100 µg. Passant-ho a valors comparables es veu que l'increment de la dosis d'aquest ha tingut un efecte de 2,4 vegades més gran en el fetge que el grup de 5 µg. A més a més, aquest també és 1,9 vegades més gran en sang.

Per una banda, si no es tenen en compte els valors atípics, les relacions calculades de l'intestí prim es mantenen molt estables, amb valors molt propers a 1. D'altra banda, en el fetge i el sèrum la relació és més elevada en els ratolins de 100 µg, però a mesura que van passant les hores els valors més alts pertanyen al grup de 5 µg.

Temps (hores)	Relació 100 µg /5 µg del % de colecalciferol al fetge	Relació 100 µg /5 µg del % de colecalciferol a l'intestí prim	Relació 100 µg /5 µg del % de colecalciferol en sèrum
2	2,473466	1,098563	1,912785
4	0,545517	5,366772	2,427808
6	0,744574	1,550529	1,258313
8	0,67293	1,124964	0,185802
10	0,515458	0,419054	0,435624

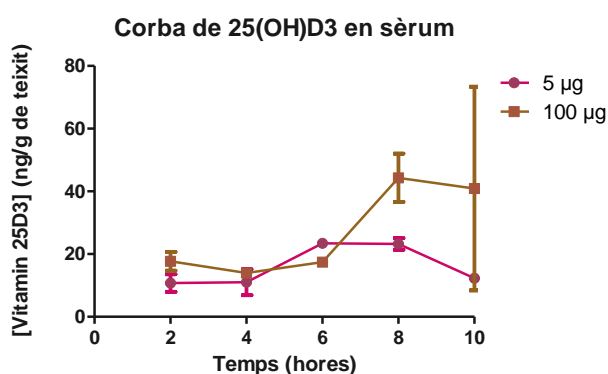
Taula 3. Relació entre les diferents dosis de vitamina D₃. Comparació dels dos grups experimentals de 5 i 100 micrograms de colecalciferol als diferents teixits que s'han analitzat. Els valors s'han calculat fent la relació (dividint el % de colecalciferol de 100 µg del % obtingut amb el grup de 5 µg). Aquest valor ens indica quantes vegades més el % de colecalciferol és més alt o més baix en els ratolins els quals se'ls ha administrat 100 µg respecte els de 5 µg de colecalciferol. S'ha realitzat amb el % i no amb la quantitat de vitamina D₃ present al teixit perquè sigui més fàcil de comparar. Si el valor > 1: la quantitat de colecalciferol, expressada en %, és més gran en grup B, si el valor = 1: la quantitat de colecalciferol és igual en ambdós grups, si el valor < 1: la quantitat de colecalciferol, expressat en %, és més gran en el grup de 5 µg.

6.5 Quantificació de la vitamina 25-hidroxicolecalciferol

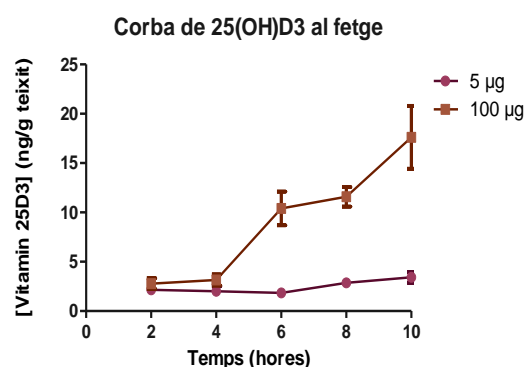
Finalment, es va analitzar el procés del metabòlit 25-hidroxicolecalciferol. Aquest es va estudiar per tal de comparar la presència d'aquesta molècula en els diferents teixits, específicament en sèrum per determinar la presència en cada hora i en el teixit hepàtic ja que és on hi pot haver un canvi estructural del colecalciferol.

Els dos gràfics coincideixen amb una estabilitat constant del grup A. S'observa com les rectes no varien molt al llarg del temps, així doncs, no presenta diferències significatives. És a dir, es manté en quantitats molt similars, per tant, l'acció de l'enzim hidroxilasa (CYP2R1) del fetge no està estimulada o incrementada per tenir un augment de colecalciferol.

Per altra banda, hi ha un increment d'aquest metabòlit amb els ratolins els quals se'ls ha administrat una dosi més elevada del suplement oral. L'increment en sèrum és dona a les vuit hores, arribant al pic màxim amb una concentració de $44,31 \pm 7,7$ ng/g de teixit. En quant al fetge es veu que l'augment comença a donar-se a les sis hores, arribant al pic màxim a les deu hores amb una concentració de $17,62 \pm 6,38$ ng/g.



D)



E)

Figura 6. Concentració de 25-hidroxicolecalciferol present al fetge i en sèrum relacionat amb el temps transcorregut. Informació de la quantitat de vitamina 25(OH)D₃ (ng/g de teixit) al fetge durant i en sèrum durant deu hores. Població N=20 ratolins mascles de 45 dies de vida, soca BL6. Els grups intervinguts es diferenciaven en la dosi administrada: 5 µg (color marró – forma de cercle) i 100 µg (color granat – forma quadrada). La variable Y determina la quantitat de 25-hidroxicolecalciferol (ng/g de teixit) i la variable X representa el temps en hores. El gràfic D representa els resultats obtinguts del sèrum i la gràfica E mostra els valors obtinguts dels teixit hepàtic. Els resultats es mostren com a mitjana \pm DE.

7. Discussió

Després de la suplementació amb altes dosis (100 µg) de vitamina D₃ es va veure que el pic més alt en sang de vitamina D₃ d'una persona era a les deu hores. Això va fer qüestionar que la cinètica de la biodisponibilitat podria estar influenciada per la dosi d'administració de colecalciferol, a més podria haver-hi un possible emmagatzematge de les altes dosis a l'intestí prim o al fetge. Així doncs, per tal de valorar aquest factor es va voler determinar la seva biodisponibilitat amb una suplementació oral de diferents dosis de colecalciferol i es va quantificar concentració present en diferents teixits de ratolins (fetge, intestí prim i sèrum). D'aquesta manera es va poder comparar els canvis de concentració de colecalciferol i 25-hidroxicolecalciferol a l'organisme.

En primer lloc, es va comprovar que la presència en sang de colecalciferol tenia un efecte diferent en ambdues dosis. Com a confirmació de la primera hipòtesis es va veure que els ratolins amb una dosi de 5 µg o 40 RDI tenien una concentració en sang estable i progressiva fins les vuit hores el qual presentava un increment molt pronunciat, arribant a les concentracions més altes. No obstant això, els ratolins amb 100 µg o 800 RDI presentaven una concentració de colecalciferol estable amb valors molt similars durant les deu hores (gràfica 1, taula 2). Cal remarcar que, en aquest grup, no es pot determinar el temps mig de la concentració màxima ja que no veiem una disminució posterior, seria necessari augmentar el temps post-prandial dels ratolins. A més a més, l'administració de la vitamina es va realitzar amb oli d'oliva, un producte que conté fitosterols. Segons A. Goncalves et al. (30) aquests intervenen en l'absorció intestinal de vitamina D₃ degut a la competència per la incorporació micel·lar dels dos components.

Gràcies a la relació dels dos grups s'ha pogut determinar que la biodisponibilitat de la vitamina D₃ és més alta en el grup de 5 µg. Malgrat que la concentració màxima de colecalciferol era més elevada en els ratolins amb 800 RDI de dosi, degut a que la dosi administrada era vint vegades major, si es comparava el percentatge i la relació entre ambdós grups (figura 5, taula 3) es podia veure com el total de colecalciferol absorbit, era més alt amb la dosi de 5 µg. Aquest resultat podria ser degut a la

saturació dels transportadors i per tant la seva eliminació per femta, la transformació d'aquesta a 25(OH)D₃ o la via utilitzada pel colecalciferol (via porta o quilomicro).

Per resoldre aquestes hipòtesis es va valorar els resultats obtinguts a l'intestí prim. En primer lloc, es va desmentir la hipòtesis sobre la saturació dels transportadors ja que hi va haver un increment molt elevat de colecalciferol en els ratolins de 100 µg de dosis arribant a tenir una concentració de 397,92 ng/g de teixit (gràfica 2). A més a més, la relació de vitamina D₃ absorbida entre els dos grups era molt similar (figura 5, taula 3), exceptuant a les deu hores. Per tant, es pot dir que s'absorbia majoritàriament la mateixa quantitat en ambdós grups. D.Hollander i el seu equip indiquen que no hi ha una saturació dels transportadors en l'absorció intestinal de vitamina D (27).

Altrament, la molècula 25(OH)D₃ en sèrum es mantenia constant durant les deu hores en ambdós casos (figura 6), per tant sabem que sempre s'havia mantingut la mateixa concentració. Tot i que l'àpat és un factor que pot influenciar sobre l'absorció de colecalciferol s'ha vist que les concentracions de 25-hidroxicolecalciferol es mantenen constants en sang (32), aquesta informació recolza els resultats obtinguts per l'estudi.

Un cop desmentides les hipòtesis es va concloure que l'intestí prim absorbeix el mateix percentatge de colecalciferol en ambdues dosis i el reté fins el seu transport al fetge. Aquest pot ser mitjançant la unió als quilomicrons o la unió a un transportador (BDP). Així doncs, es va pensar que la diferència en sèrum entre els dos grups (gràfica 1) podia ser degut a la via de transport de la vitamina D₃.

Per una banda es creu que en dosis baixes, el colecalciferol s'uneix als quilomicrons presents als enteròcits i se'n va per la limfa fins arribar a la circulació sanguínia, provocant un augment progressiu d'aquest en sang. Per altra banda, es pensa que amb dosis altes és possible que una quantitat de vitamina D₃ s'uneixi als quilomicrons i una altra quantitat s'uneixi a la proteïna BDP que es troba en sang de manera més ràpida, per aquest motiu es manté constant durant tot el temps. Concretament, es va comprovar en un estudi que més del 50% d'aquest eren transportats per quilomicro i aproximadament un 20% era transportat per lipoproteïnes (32). No obstant això, per obtenir uns resultats més específics i fer una conclusió més acurada s'hauria de quantificar la concentració de quilomicro i BDP present en sang.

Finalment, es va veure com el teixit hepàtic és un possible reservori del colecalciferol. Aquest fet es veu degut a l'increment de la concentració d'aquesta molècula després de deu hores de la ingesta en ambdues dosis (gràfic 3). Els valors més alts són $82,42 \pm 42,01$ ng/g de teixit en el grup de 40 RDI i $849,75 \pm 261,88$ ng/g en el grup de 800 RDI. Desafortunadament, no podem saber si aquest valor representa la concentració màxima ja que no sabem si aquest disminuirà o augmentarà en les hores posteriors.

8. Limitacions

Les limitacions que ens hem trobat al llarg de l'estudi són les següents.

En primer lloc la possible interacció dels fitosterols presents en l'oli d'oliva pot interferir en l'absorció d'aquesta vitamina (30). Es va pensar d'administrar-ho amb un altre vehicle, però això no era disponible en el grup de recerca en el moment de l'elaboració d'aquest Treball de Fi de Grau.

Els ratolins també ens van suposar una limitació en quant alguns paràmetres. Primerament, degut a l'escassa quantitat d'aquests no es va poder utilitzar un grup control sense dosis de vitamina D en cada hora per una millor comparació. A més a més, hagués sigut més adequat realitzar l'experiment amb un altre tipus d'animal com ara les rates. D'aquesta manera hagués sigut més fàcil l'extracció de sang cardíaca i s'hagués pogut extreure teixit adipós per fer la comparació d'emmagatzematge entre el teixit hepàtic i el teixit lipídic.

Per tal d'arribar a una conclusió més complexa hagués sigut necessari la quantificació dels quilomicrons i de la proteïna transportadora BDP. D'aquesta manera s'hagués pogut determinar més clarament la via de transport que utilitza el colecalciferol, per la limfa mitjançant els quilomicrons o per sang mitjançant la BDP.

Finalment, seria necessari la suplementació de ratolins amb un temps transcorregut més llarg, de 12 o 24 hores per tal de fer una corba més clara de la biodisponibilitat de la vitamina D i observar quan hi ha una disminució d'aquesta. Altrament, també hagués sigut útil quantificar la vitamina D de la femta de ratolí ja que d'aquesta manera s'hagués pogut determinar amb més precisió la quantitat no absorbida.

9. Conclusions

Primerament, es va confirmar clarament que el pic més elevat de vitamina D₃ es troba a les vuit-deu hores després de la ingesta d'aquesta, inclús en dosis elevades es pot donar més tard. A partir d'aquí es va mirar l'efecte de la dosis administrada i la quantitat de vitamina D₃ per conèixer la seva biodisponibilitat.

Si ens basem en la relació d'ambdues dosis, la conclusió que s'ha extret en quant a la dosis és que la biodisponibilitat de la vitamina D₃ és major en ingestes baixes. No obstant això, si mirem la concentració absorbida de cada dosis és més elevada en el grup B ja que el 6,71% de 100 micrograms dóna un valor major que el 9,84% de 5 micrograms.

La conclusió en quant a la quantitat de colecalciferol del grup A és molt similar en tots els teixits ja que es mostra un pic elevat a les deu hores en tots ells, per contra, en el grup B hi ha una absorció molt elevada a les quatre hores i després és manté constant en sang i finalment té un augment molt característic al teixit hepàtic.

Finalment, podem concloure que amb una dosis de 100 micrograms l'absorció intestinal del ratolí no es satura ja que en relació a les dosis baixes s'absorbeix exactament la mateixa proporció. Altrament, degut a l'increment del colecalciferol en el fetge en ambdues dosis, es pot concloure que aquest teixit és el reservori d'emmagatzematge d'aquesta vitamina a altes dosis.

10. Bibliografía

1. OMS | Administración de suplementos de vitamina D a niños con infecciones respiratorias. WHO [Internet]. World Health Organization; 2015 [cited 2018 Jun 17]; Available from: http://www.who.int/elena/titles/vitamind_pneumonia_children/es/
2. Valdivielso JM, Cannata-Andía J, Coll B, Fernández E. A new role for vitamin D receptor activation in chronic kidney disease Valdivielso JM, Cannata-Andía J, Coll B, Fernández E. A new role for vitamin D receptor activation in chronic kidney disease. Am J Physiol Ren Physiol [Internet]. 2009 [cited 2018 Jun 13];297:1502–9. Available from: <https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/ajprenal.00130.2009>
3. Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. Nephrol Dial Transplant [Internet]. Oxford University Press; 2010 Sep 1 [cited 2018 Jun 13];25(9):2850–65. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfq313>
4. Brown AJ, Dusso AS, Slatopolsky E. Vitamin D analogues for secondary hyperparathyroidism. [cited 2018 Jun 13]; Available from: https://watermark.silverchair.com/170010.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAccwggHDBgkqhkiG9w0BBwagggG0MII BsAIBADCCAakGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMai2PFU2kxWwFxyblAgEQgIBegJo_rQTaHTWmYekpRyM9-e26fvOrSQcC3ntCS9H4xy1y11x
5. Chen TC. 25-Hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase (CYP27B1) is a new class of tumor suppressor in the prostate. Anticancer Res [Internet]. [cited 2018 Jun 17];28(4A):2015–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18649741>
6. Süle K, Szentmihályi K, Szabó G, Kleiner D, Varga I, Egresi A, et al. Metal- and redox homeostasis in prostate cancer with vitamin D3 supplementation. Biomed

- Pharmacother [Internet]. Elsevier Masson; 2018 Sep 1 [cited 2018 Jun 13];105:558–65. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217371858?via%3Dihub>
7. Moss GP. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY and INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY NOMENCLATURE OF STEROIDS (Recommendations 1989). 1989 [cited 2018 Jun 17];61(10):1783–822. Available from: <https://www.iupac.org/publications/pac/1989/pdf/6110x1783.pdf>
 8. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. Chem Biol [Internet]. NIH Public Access; 2014 Mar 20 [cited 2018 Jun 17];21(3):319–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24529992>
 9. Mostafa WZ, Hegazy RA. Vitamin D and the skin: Focus on a complex relationship: A review. J Adv Res [Internet]. Elsevier; 2015 Nov [cited 2018 Jun 17];6(6):793–804. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26644915>
 10. Christakos S, Ajibade D V, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. Endocrinol Metab Clin North Am [Internet]. NIH Public Access; 2010 Jun [cited 2018 Jun 17];39(2):243–53, table of contents. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20511049>
 11. Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. National Academy of Sciences; 2004 May 18 [cited 2018 Jun 17];101(20):7711–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15128933>
 12. Feldman D, Pike JW, Glorieux FH. Vitamin D. Second edi. Feldman D, Glorieux FH, J.Wesley Pike, editors. Elsevier Academic Press; 2005. 15-19 p.
 13. Bresson J-L, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, Hirsch-Ernst K-I, et al. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin D EFSA

- Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). EFSA J [Internet]. 2016 [cited 2018 Jun 17];179. Available from: www.efsa.europa.eu/efsajournal
14. András G, István T, János J, Ferenc H. [Infectious complications of primary osteosynthesis in aged patients]. Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb [Internet]. 1975 [cited 2018 Jun 17];18(4):286–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1594>
 15. Kogawa M, Findlay DM, Anderson PH, Ormsby R, Vincent C, Morris HA, et al. Osteoclastic Metabolism of 25(OH)-Vitamin D₃: A Potential Mechanism for Optimization of Bone Resorption. Endocrinology [Internet]. 2010 Oct [cited 2018 Jun 17];151(10):4613–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739402>
 16. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, et al. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D₃ to “program” T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. Nat Immunol [Internet]. Nature Publishing Group; 2007 Mar 28 [cited 2018 Jun 17];8(3):285–93. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni1433>
 17. Coussens AK, Martineau AR, Wilkinson RJ. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Actions of Vitamin D in Combating TB/HIV. Scientifica (Cairo) [Internet]. Hindawi; 2014 Jul 2 [cited 2018 Jun 17];2014:903680. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25101194>
 18. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab [Internet]. Elsevier; 2011 Aug 1 [cited 2018 Jun 17];25(4):531–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521690X1100042X>
 19. U S Food and Drug Administration Home Page [Internet]. [cited 2018 Jun 19]. Available from: <https://www.fda.gov/>
 20. Tso P, Fujimoto K. The absorption and transport of lipids by the small intestine. Brain Res Bull [Internet]. [cited 2018 Jun 20];27(3–4):477–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1959049>

21. Hollis BW, Lowery JW, Pittard WB, Guy DG, Hansen JW. Effect of age on the intestinal absorption of vitamin D3-palmitate and nonesterified vitamin D2 in the term human infant. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1996 Apr [cited 2018 Jun 20];81(4):1385–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8636338>
22. Rautureau M, Rambaud JC. Aqueous solubilisation of vitamin D3 in normal man. *Gut* [Internet]. BMJ Publishing Group; 1981 May 1 [cited 2018 Jun 20];22(5):393–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6265326>
23. Reboul E, Borel P. Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2011 Oct [cited 2018 Jun 20];50(4):388–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763723>
24. Maislos M, Shany S. Bile salt deficiency and the absorption of vitamin D metabolites. In vivo study in the rat. *Isr J Med Sci* [Internet]. 1987 Nov [cited 2018 Jun 20];23(11):1114–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2830204>
25. Maislos M, Silver J, Fainaru M. Intestinal Absorption of Vitamin D Sterols: Differential Absorption into Lymph and Portal Blood in the Rat. *Gastroenterology* [Internet]. 1981 [cited 2018 Jun 20];80:1528–34. Available from: [https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085\(81\)90268-7/pdf](https://www.gastrojournal.org/article/0016-5085(81)90268-7/pdf)
26. Borel P, Caillaud D, Cano NJ. Vitamin D Bioavailability: State of the Art. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2015 Jul 29 [cited 2018 Jul 1];55(9):1193–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24915331>
27. Hollander D, Truscott TC. Mechanism and site of small intestinal uptake of vitamin D3 in pharmacological concentrations. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1976 Sep 1 [cited 2018 Jul 2];29(9):970–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/183493>
28. Hollander D, Muralidhara KS, Zimmerman A. Vitamin D-3 intestinal absorption in

- vivo: influence of fatty acids, bile salts, and perfusate pH on absorption. *Gut* [Internet]. 1978 Apr [cited 2018 Jul 2];19(4):267–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826>
29. Jones KS, Schoenmakers I, Bluck LJC, Ding S, Prentice A. Plasma appearance and disappearance of an oral dose of 25-hydroxyvitamin D₂ in healthy adults. *Br J Nutr* [Internet]. Cambridge University Press; 2012 Apr [cited 2018 Jun 20];107(8):1128–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896243>
 30. Goncalves A, Gleize B, Bott R, Nowicki M, Amiot M-J, Lairon D, et al. Phytosterols can impair vitamin D intestinal absorption in vitro and in mice. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2011 Sep [cited 2018 Jun 21];55(S2):S303–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21714122>
 31. Aronov PA, Hall LM, Dettmer K, Stephensen CB, Hammock BD. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. NIH Public Access; 2008 Jul [cited 2018 Jun 17];391(5):1917–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437365>
 32. Dawson-Hughes B, Harris SS, Palermo NJ, Ceglia L, Rasmussen H. Meal conditions affect the absorption of supplemental vitamin D₃ but not the plasma 25-hydroxyvitamin D response to supplementation. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2013 Aug [cited 2018 Jul 2];28(8):1778–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23427007>